

117

温熱感受性リポソームを用いた臓器選択的 遺伝子導入法による癌治療の基礎的研究

(研究課題番号：05671341)

平成5年度～平成7年度科学研究費補助金（一般研究C）
研究成果報告書



平成 9年 3月

研究代表者 木原 健

(東京女子医科大学 医学部 講師)



温熱感受性リポソームを用いた臓器選択的 遺伝子導入法による癌治療の基礎的研究

(研究課題番号：05671341)

平成5年度～平成7年度科学研究費補助金（一般研究C）
研究成果報告書

平成 9年 3月
研究代表者 木原 健
(東京女子医科大学 医学部 講師)

はしがき

平成5年度から平成7年度までの3年間にわたる、文部省科学研究費補助金（一般研究C）『温熱感受性リポソームを用いた臓器選択的遺伝子導入法による癌治療の基礎的研究』の研究課題に対し、研究成果をまとめたのでここに研究報告書を提出する。

○研究組織

研究代表者：木原 健（東京女子医科大学 医学部 講師）
研究分担者：伊藤文夫（東京女子医科大学 医学部 助手）
研究分担者：前田佳子（東京女子医科大学 医学部 助手）
研究分担者：東間 紘（東京女子医科大学 医学部 教授）

○研究経費

平成5年度	500千円
平成6年度	900千円
平成7年度	800千円
計	2,200千円

研究の成果

I. はじめに

遺伝子治療を最終的な目標として種々のベクターを用いた真核細胞に対する遺伝子導入の研究が現在注目され、臓器特異的な遺伝子導入を容易にするために、肝に対するHBウイルス、リンパ球に対するHTLVなど種々のウイルスベクターが詳細に研究されている。

しかし、腎臓に関しては、特異性の高いベクターは知られていない。ウイルスベクターはウイルスの複製に必要な領域を切除し、病原性をのぞき本来の感染力を利用して遺伝子導入をはかるものであり、現段階でウイルスの病原性に関してはほぼ解決された感があるが、尚、免疫原生などの点で問題が残されている。

リポソームはリン脂質を主体とした脂質人工膜を超音波処理などによりマイクロカプセル化したものであり、天然に存在する脂質を素材とした粒子なのでそれ自体による副作用は少なく、又構造上水層と油層があるので水溶性、脂溶性いずれの薬剤も封入できるため、生体内のdrug carrierとして脚光を集めている。近年DNA carrierとしても研究され、標的細胞に対するDNA導入効率を向上させるため、種々の技術が開発されている。一方、リポソームには加温によりリポソームを構成する脂質膜の透過性が亢進し、内封する物質を放出しやすくなる性質がある。リポソームを用いDNAを導入する場合、融合、エンドサイトーシスなどのリポソーム細胞間相互作用によってトランスフェクションが成立するが、温度条件の変化がそれらの相互作用に及ぼす影響はほとんど知られていない。

もし、導入効率が温度条件により変化するならば、導入効率を最も高める至適温度を同定した上で遺伝子導入の対象臓器を局所灌流な

どにより至適温度条件におければ、in vivoにおいても標的臓器に対し、選択性の高い導入が可能と考えられる。腎臓は一对あり、解剖学的にも局所灌流に適した臓器であり、温度調節を比較的容易に行いやすいと考えられる。以上の発想より腎臓を標的臓器とする選択的な遺伝子導入を最終的な目標としてDNAを内封させたりポソームを調製し、腫瘍細胞及び腎由来の細胞株に対する遺伝子導入を種々の温度条件下で行い、その導入効率について検討した。

II. 材料及び方法

(1)細胞培養

遺伝子導入のターゲットとしてヒト子宮頸癌由来のHeLa（ヒューマンサイエンス研究資源バンク）、ブタ腎尿管由来の非腫瘍細胞LLC-PK1（ヒューマンサイエンス研究資源バンク）、ヒト正常メサングウム細胞由来のCryoNHMC（Clonetics社）の3種類の細胞株を用いた。

HeLa、LLC-PK1は、ともに10%FCSを含むDMEM培養液で、一方、CryoNHMCは、10%FCSを含む専用培地（Clonetics社）で4%CO₂、37℃の条件下で維持培養を行った。

(2)導入遺伝子の調製

導入遺伝子としてpGL3-Control Vector（Promega社）を用いた。JM109を同遺伝子で形質転換後、plasmidの大量調製を行い、リン酸カルシウム法には超純水で、リポソーム法にはPBS（-）で調製した。

(3)リン酸カルシウム-DNA共沈液の調製

120 μ gのpGL-3-Control Vector（Progema社）に超純水を加え計2.7mlとした後、2.5M CaCl₂ 300 μ lを加えた。この混合液にさらに2×HBS 3.0mlを緩徐に加え、室温に20分間静置した。また、対照実験用には、DNAを加えずに同様に調製した溶液を準備した。

(4) リポソームの調製

リポソームを構成するリン脂質としてジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC)、ジステアロイルフォスファチジルコリン (DSPC)、及びN-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-ジドデシル-ロングルタメイトクロライド (TMAG) を用い、DPPC、DSPCを日本油脂株式会社より、TMAGを相互薬工社より購入した。

- 1) DPPC12mg、DSPC1mg、TMAG1mg (モル比約9 : 1 : 1) をクロロホルムに溶解し、フラスコに入れ60℃の水槽内で加温しつつロータリーでバポレーターでクロロホルムを蒸発させ、リポドフィルムを作製した。
- 2) 作製したリポドフィルムにpGL-3-Control Vector 800 μ gを溶かしたPBS (-) 20mlを注入し、ボルテックスミキサーで1~2分処理。
- 3) 2)で出来た乳濁液をエクストルーダー (Lipex Biomembrane社) を用い、200nmのポアサイズのポリカルボネート膜によるフィルターを通し、large Unilamellar vesicle (LUV) を調製した。
- 4) 最終的に調製したLUVについて動的光散乱法によりNICOMP370型 (Particle Sizing System社) を用い、粒子分布を分析し、示差走査熱量計を用い、相転移温度を測定した。

(5)リン酸カルシウム法による遺伝子導入法

各細胞株を、35mm培養皿に維持培養で使用した培養液2ml、約 1×10^5 個になるように12枚ずつに播き、4%CO₂、37℃の条件下に培養を行った。8時間後、各細胞株の培養皿12枚の内、10枚について、リン酸カルシウム-DNA共沈液を200 μ lずつ (pGL3-Control Vector 4 μ g相当) 加え、緩徐に振とうし、さらにこの10枚を2枚ずつ5群に分け、それぞれを4℃、25℃、37℃、40℃、42℃に静置した。残る2枚については、同様に調製したDNAを含まないリン酸カルシウム溶液200 μ lを各培養皿に加え、37℃に静置した。2時間後、すべての培養皿を2%CO₂、37℃の培養条件に移し、18時間維持培養を行った。培養液を破棄し、PBS (-) で2度洗浄後、新しい培養液2mlを加え、5%CO₂、37℃の培養条件でさらに24時間培養を行った。

(6)リポソームによる遺伝子導入法

前者と同様に、35mm培養皿に前述の培養液2ml中に約 1×10^5 個になるよう、各細胞株につき12枚ずつ播き、4%CO₂、37℃で培養を行った。各細胞株について、8時間後、リポソーム懸濁液25 μ l (pGL3-Control Vector 1 μ g相当) を10枚に加え、緩徐に振とうし、2枚ずつ4℃、25℃、37℃、40℃、42℃に静置した。残る2枚については、DNAを含まない同量のリポソーム懸濁液を加え37℃に静置した。2時間後、すべての培養皿を2%CO₂、37℃の培養条件に移し、18時間維持培養を行った。培養液を破棄し、PBS (-) で2度洗浄後、新しい培養液2mlを加え、5%CO₂、37℃の培養条件でさらに24時間培養を続けた。

(7)発現ルシフェラーゼの活性測定

ルシフェラーゼ活性の測定にはLuciferase Assay System (Promega社)を用いた。各培養皿の培養液を破棄し、PBS (-) で2度洗浄後、1×Cell Culture Lysis Reagent (125mM Tris, pH7.8 with H₃PO₄; 10mM CDTA; 10mM DTT; 50% glycerol; 5% Triton X-100) 125 μ lを細胞層に重層した。速やかに、同溶液で細胞を剥離、溶解し書く培養皿毎に集め、12000g、5秒間遠心し、上清を-80°Cに凍結保存した。この細胞溶解液は、測定直前に解凍し、内10 μ lと、ルシフェラーゼ基質液100 μ lを反応させ、Luminometer 125l (バイオオービット社)で反応開始から30秒間の蛍光発光積算量を測定した。測定結果は、2枚の対をなす培養皿の平均値を用い、コントロールの平均値を差し引いた値で表した。

Ⅲ. 結果

(1)調製したLUVの構造

最終的に調製されたLUVは動的光散法により粒子径を測定した結果、220nmをピークとする比較的均一な粒子であり、25℃で調製2時間後も分布はほとんど変わらず安定したりポソームが作製できた。又、カロリメトリー法による相転移温度は41℃であった。

(2)細胞株による遺伝子導入効率の比較

表1に各条件におけるルシフェラーゼ活性の値を示す。リン酸カルシウム法、リポソーム法ともに40℃以下の温度条件ではLLC-PK1、HeLa、CryoNHMCの順で導入効率が高く、特にLLCPK-1では他の2株に比べ、顕著に高い値を示した。

(3)温度による遺伝子導入効率の差異

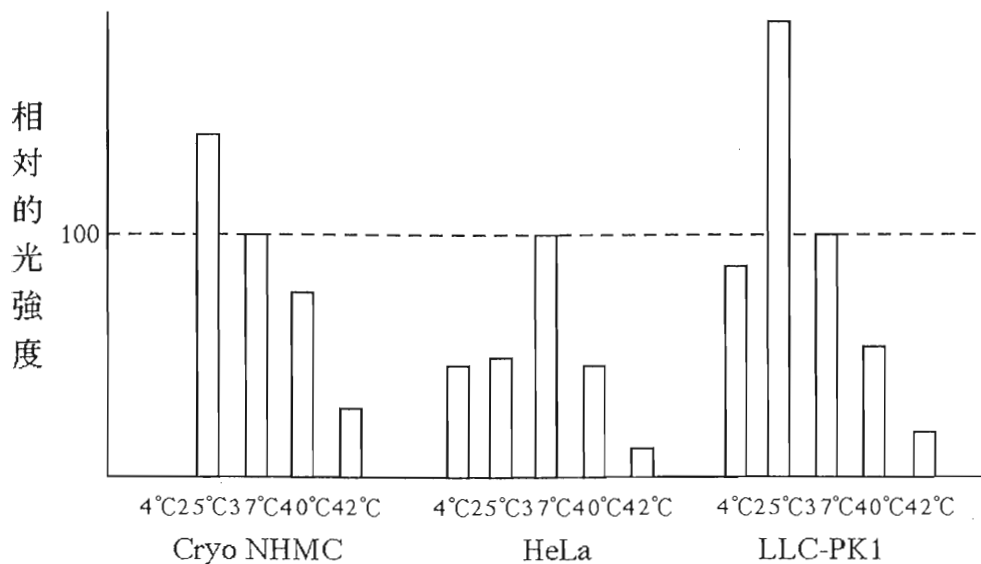
図1、2は各細胞株の温度による遺伝子導入効率の差異をリン酸カルシウム法とリポソーム法とで比較したものである。導入法により温度への感受性が異なる結果となった。すなわちリン酸アルミウム法では、いずれの細胞株も25～37℃で最大の導入効率が認められるのに対し、リポソーム法ではCryoNHMCは40℃までは温度を上げるにしたがって導入が向上したが、他の2株は40℃までは温度によって導入効率にあまり差異はなく、又LLC-PK1を除き40℃で最大の導入効率が示された。42℃条件下では両導入法ともに導入効率の低下が決められたが、リポソーム法においてはその傾向が顕著であった。

表1 ルシフェラーゼ活性測定値

<u>リン酸カルシウム法</u>	CryoNHMC	HeLa	LLC-PK1
4°C	0.0	1511.2	9583.3
25°C	38.4	1642.9	19538.6
37°C	25.7	3145.4	10544.0
40°C	20.3	1520.1	7240.5
42°C	7.3	452.5	2416.1

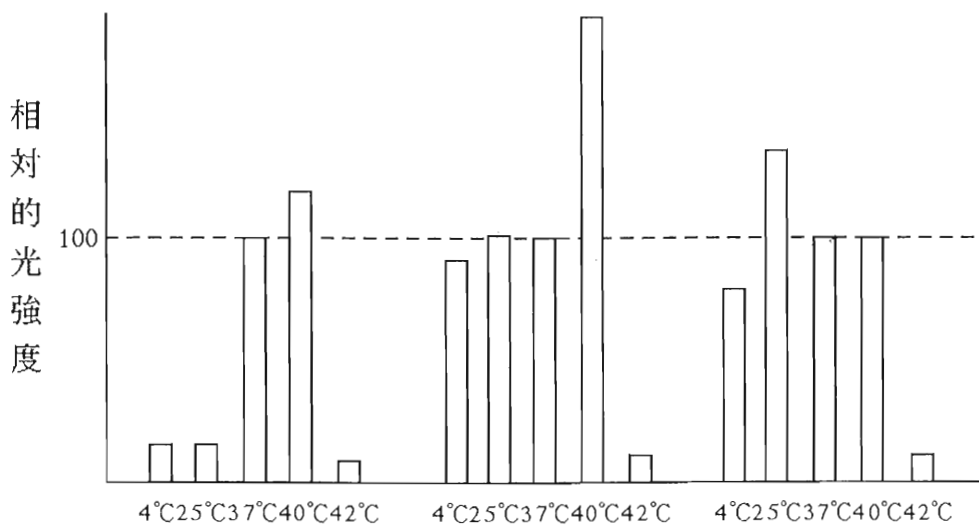
<u>リポソーム法</u>	CryoNHMC	HeLa	LLC-PK1
4°C	1.9	5.1	952.6
25°C	1.9	5.6	1661.0
37°C	11.5	5.5	1144.0
40°C	14.3	10.2	1142.5
42°C	0.7	0.5	95.8

図1 温度条件による遺伝子導入効率の変化（リン酸カルシウム法）



37°C条件のルシフェラーゼ活性を100とする。

図2 温度条件による遺伝子導入効率の変化（リポソーム法）



37°C条件のルシフェラーゼ活性を100とする。

IV. 考察

遺伝子導入を目的としてリポソームを使用する場合、リポソーム事体が生体膜に近いリン脂質で構成されるため、細胞に対する障害性が低く、生体にも直接導入が可能であり、又リポソームに包み込めれば導入する物質の大きさに制限なく核酸の他、タンパク質も導入可能であることなどの利点があるが、従来の単純なりポソーム調製法では遺伝子導入効率が低いため、リポソーム膜表面に種々のレクチンや抗体、センダイウイルスなどを融合することにより、導入効率を高める技術が開発されている。リポソームの組成に正電荷脂質を加え、リポソームの表面の荷電を正にし、通常表面電荷が負であるDNAや細胞膜との親和性を高める方法もその一端であり、本研究においても正電荷リン脂質であるTMAGをリポソームの組成に加えた。実験では、リン酸カルシウム法とリポソーム法の導入効率をルシフェラーゼ活性を用い比較した。1wellあたりのPGL3-Control Vectorの投与量がリン酸カルシウム法はりポソーム法の4倍であったため、単純比較は出来ないが、これを考慮してもリン酸カルシウム法の導入効率はリポソーム法に比べ、明らかに優れていた。しかし37℃温度条件下ではより細胞膜との親和性の高いリン脂質を用いたり、前述の如くりポソーム表面に種々の物質を融合することにより、はるかにすぐれた導入効率を示すリポソームが数多く調製されている。

今回、リポソームの組成リン脂質としてTMAGの他、DPPC、DSPCを選択したのはリポソームの温熱感受性を考慮したためである。リポソームには、それを構成するリン脂質の組成により一定の相転移温度が生じる。相転移温度以下ではリポソームはゲル相にあり、内封する物質は比較的安定に保持されるが、相転移温度以上に加温

されると、液晶相となり、膜透過性が著しく高くなる性質を有する。我々はDPPCとDSPCをモル比9 : 1で調製したLUVにCDDPを内封したりポソーム製剤を用い、担癌マウスに対する実験的検討を行ってきた。この組成で調製されたLUVの相転移温度は41℃であり、マウスの腫瘍部を選択的に41℃以上に加温すると静注されたCDDP内封LUVが腫瘍部で選択的に相転移し、CDDPを放出し、腫瘍部に選択的にCDDPが集積していることが確認された。

本研究では、加温により細胞の生物学的活性に著しい障害を与えない相転移温度のリポソームを調製することを目的としてDPPC、DSPCをマウス実験のリポソームと同モル比で用い、さらに導入効率を上げるため、TMAGを少量加えたが、相転移温度は変わらず41℃を示すリポソームが調製できた。

今回の研究で、温度による遺伝子導入効率の変化をみると、リン酸カルシウム法ではいずれの細胞株でも25℃～37℃で最大効率を得られ、4℃又は40℃以上では効率が低下する傾向がみられるのに対し、リポソーム法においては、CryoNHMC以外は温度条件を変えてもあまり導入効率に差異はみられなかった。これはリン酸カルシウム法による遺伝子導入が細胞のエンドサイトーシスに依存するため細胞の生理学的活動の低下する高低温領域ではエンドサイトーシスが低下したことによると考えられるのに対し、リポソーム法ではエンドサイトーシスのみならず、細胞膜との物理的融合によっても導入が達成されるため、温度による影響を必ずしも受けなかった可能性が考えられる。むしろエンドサイトーシスのみによるリン酸カルシウム法では効率が低下する40℃でもリポソーム法の導入効率は37℃に比べ同等、もしくは高くなっていることから、融合による導入は温度条件を上げることによる促進される可能性が示唆された。しかし42℃に条件を上げるとリポソーム法では40℃に比べ、1/12～1/20

と著しい効率の低下を示した。リン酸カルシウム法でも42℃では40℃の1/3程度に低下したが、40℃までの両導入法の効率の推移をみると、リポソーム法42℃条件の著しい導入効率の低下がエンドサイトーシスの低下のみに起因するとは思われず、他の因子の影響が考えられた。リポソームは前述の如く、相転移温度以上に加温されると膜透過性が著しく亢進する性質があり、本研究のリポソーム相転移温度が41℃であったことから、42℃条件で著しく導入効率が低下した原因として標的細胞に対する遺伝子導入が達成される以前にリポソームが相転移し、内封するPGL3-Control Vectorが細胞外培養液中に放出された可能性が示唆された。

リポソームを用いたin vivoにおける遺伝子導入は標的臓器の栄養動脈より投与するのが選択性の高い方法と考えられるが、この場合、標的臓器灌流後、静脈より体循環に溢流するリポソームが標的臓器外組織をトランスフェクトする危険性がある。相転移温度以上で遺伝子がリポソームより放出されるならば、体温より若干低い相転移温度のリポソームを調製し、標的臓器を局所灌流により相転移以下の温度に保った上でリポソームを局所灌流すれば、標的臓器をトランスフェクトした後、体循環に溢流したりリポソームは体温により相転移し、遺伝子を血中に放出するため他臓器への導入は起こらず、より選択的で安全性の高い遺伝子導入が可能と考えられる。腎臓は一对あり、解剖学的にも局所灌流による温度調節などが比較的容易に行える臓器と考えられる。

今後は以上の結果を考慮し、遺伝子導入効率がより高く、生体に対し安全でかつ目的にかなった相転移温度をもつリポソームを調製し、腎を標的臓器とした動物実験から最終的には臨床に応用できる遺伝子治療法として確立すべく検討を続けていくつもりである。

温熱感受性リポソームを用いた臓器選択的遺伝子導入法
による癌治療の基礎的研究

木原 健
平成9年3月